Hochdosierte Methotrexattherapie bei Kindern mit osteogenem Sarkom

Wolfgang Spiegl

Diss. München
1983

HOCHDOSIERTE METHOTREXATTHERAPIE BEI KINDERN MIT OSTEOGENEM SARKOM

Toxizität in Abhängigkeit von der Pharmakokinetik bei Infusionen von 8 bis 12 g Methotrexat/m^2 Körperoberfläche über 4 Stunden

Wolfgang Spiegl

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546827_0015

Aus der Kinderklinik der Universität München
im Dr. v. Haunerschen Kinderspital
Direktor: Prof. Dr. O. Goetz

HOCHDOSIERTE METHOTREXATTHERAPIE BEI KINDERN MIT OSTEOGENEM SARKOM

Toxizität in Abhängigkeit von der Pharmakokinetik bei Infusionen von 8 bis 12 g Methotrexat/m^2 Körperoberfläche über 4 Stunden

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Wolfgang Spiegl
aus
Beutelsbach
Jahr
1983

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. R. Haas

Mitberichterstatter: Prof. Dr. O. Goetz

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 06. 10. 1983

Inhaltsverzeichnis Seite

1. Einleitung 1

2. Grundlagen 3

2.1. Wirkungsmechanismus von Methotrexat 3

2.2. Aufnahme des Methotrexates in die Zelle 6

2.3. Aufhebung der Methotrexatwirkung durch 5-Formyltetrahydrofolsäure (Leukovorin) 7

2.3.1. Wirkungsmechanismus von Leukovorin 7

2.3.2. Zeitpunkt, Dosis und Dauer der Leukovorintherapie 8

2.4. Toxizität des Methotrexates 9

2.5. Pharmakokinetik und Metabolisierung von Methotrexat 10

3. Eigene Untersuchungen 11

3.1. Patienten und Versuchsprotokoll 11

3.2. Bestimmung der Methotrexat-Plasmakonzentrationen 15

3.2.1. Materialien 15

3.2.2. Durchführung der Methotrexat-Bestimmung 16

3.3. Qualität der Methotrexat-Bestimmung 17

3.4. Ergebnisse 18

3.4.1. Normbereich der Methotrexat-Plasmakonzentrationen 18

3.4.2. Behandlungszyklen mit Methotrexatkonzentrationen über dem Normbereich 21

3.4.2.1. Erhöhung des 24-Stundenwertes der Methotrexatplasmakonzentrationen 21

3.4.2.2. Erhöhte Methotrexat-Plasmakonzentrationen 48 Stunden nach Infusionsende 23

Inhaltsverzeichnis 2 Seite

3.4.3. Hämatologische Toxizität 26

3.4.3.1. Schwere hämatologische Toxizität 26

3.4.3.2. Mäßige hämatologische Toxizität 28

3.4.3.3. Milde hämatologische Toxizität 28

3.4.3.4. Hämatologische Toxizität 1 bis 3 Tage nach Infusion 28

3.4.3.5. Zusammenhang zwischen der Methotrexat-Plasmakonzentration und der Leukozyten- und Thrombozytenzahl 32

3.4.4. Serumkreatininspiegel und Methotrexattoxizität 32

3.4.5. Lebertoxizität des Methotrexates 34

3.4.6. Sonstige Nebenwirkungen unter hochdosierter Methotrexattherapie 37

4. Diskussion der Ergebnisse 38

4.1. Normbereich der Methotrexatplasmakonzentrationen 38

4.2. Kriterien zur Vorhersage drohender Toxizität des Methotrexates 39

4.2.1. 24-Stundenwert der Methotrexat-Plasmakonzentration 39

4.2.2. 48-Stundenwert der Methotrexat-Plasmakonzentration 39

4.2.3. Anstieg des Serumkreatinins als Kriterium zur Vorhersage drohender Methotrexattoxizität 41

4.3. Hämatologische Toxizität 42

4.4. Hepatotoxizität 43

4.5. Sonstige Nebenwirkungen unter hochdosierter Methotrexattherapie 44

Inhaltsverzeichnis 3 Seite

5. Zusammenfassung 45

6. Literaturverzeichnis 46

7. Lebenslauf 55

1. Einleitung

Mit der Einführung der adjuvanten Chemotherapie in die Behandlung des osteogenen Sarkoms im Kindesalter konnte die rezidivfreie Überlebensrate nach zwei Jahren von 17% bei alleiniger chirurgischer Behandlung (32) auf 60-80% bei zusätzlicher adjuvanter Chemotherapie erhöht werden (22).

Die adjuvante Chemotherapie wird in der Regel als Kombinationstherapie mehrerer Zytostatika durchgeführt,wobei dem Methotrexat (MTX) in hoher Dosierung (high dose MTX-HDMTX) die größte Bedeutung zukommt.

Unter hochdosierter Methotrexattherapie werden zwei Hauptformen von Toxizität beobachtet:

Eine Form ist die direkte Schädigung durch die physikalischen Eigenschaften des Methotrexates: gelangen große Mengen von MTX in die Nierentubuli,kann Methotrexat als schwache Säure auskristallisieren,wenn im Tubulus ein saurer pH-Wert vorliegt (39).Bei geringem Urinfluß kommt es zu einer Verstopfung und teilweisen Destruktion der Tubuli (39).

Die andere Form der Toxizität beruht auf den zytotoxischen Eigenschaften des Methotrexates,wobei vor allem Gewebe mit hohem Zellumsatz betroffen sind wie Knochenmark,Schleimhäute des Gastrointestinaltraktes,Haut und Leber.Die klinischen Erscheinungen bestehen in Knochenmarksdepression,Schleimhautulzerationen im Mund und im Gastrointestinaltrakt,Dermatitis und Leberzellschaden.

Eine Studie aus den USA belegte 29 Todesfälle bei 498 Patienten, das sind 6%,als direkte Folge der Toxizität des Methotrexates (18): bei 23 Patienten lag die Todesursache in einer schweren Knochenmarksdepression mit Sepsis oder hämorrhagischer Diathese, bei 6 Patienten in Nierenversagen.

Die Niere stellt den Hauptteliminationsweg für das Methotrexat dar (17,37,51): ein vorbestehender oder durch Methotrexat selbst verursachter Nierenschaden (siehe oben) kann zur Retention großer Mengen von MTX im Körper über lange Zeit führen.

Diese Retention spiegelt sich in hohen MTX-Plasmakonzentrationen wider. Erhöhte MTX-Plasmakonzentrationen gehen gehäuft mit schwerwiegenden Komplikationen zytotoxischer Art einher (21,36,45,46,55).

Um eine verzögerte Elimination von Methotrexat und damit drohende Toxizität rechtzeitig erkennen zu können, ist die genaue Kenntnis des Normbereiches der MTX-Plasmakonzentrationen Voraussetzung. Untersuchungen dazu liegen für Methotrexatdosen bis 8 g/m^2 Körperoberfläche vor (21,36,45,55), der Dosisbereich über 8 g/m^2 ist noch wenig untersucht (26).

Ziel dieser Arbeit ist

- einen Normbereich für die Methotrexatplasmakonzentrationen im Zeitraum von 0 bis 48 Stunden nach Infusion von hochdosiertem Methotrexat von 8-12 g/m^2 Körperoberfläche über 4 Stunden anzugeben

- die Toxizität des Methotrexates in Abhängigkeit von der Pharmakokinetik zu untersuchen

2. Grundlagen

2.1. Wirkungsmechanismus von Methotrexat

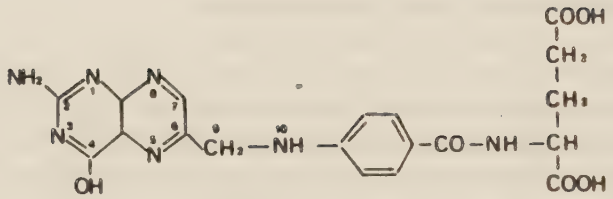
Als strukturanaloges Derivat der Folsäure (Abb. 1) bindet sich Methotrexat fest,aber reversibel an das Enzym Dihydrofolsäurereduktase.Die Dihydrofolsäurereduktase ist damit für ihre eigentliche Aufgabe blockiert,die Reduktion von Dihydrofolsäure in Tetrahydrofolsäure (4, Abb. 2).

Tetrahydrofolsäure wirkt als Koenzym bei der Übertragung von C_1-Bruchstücken und ist beteiligt an der Synthese von Thymidinmonophosphat und Inosinsäure (Abb. 2).Thymidinmonophosphat ist das spezifische Nukleotid für DNS,Inosinsäure ist als Purinvorläufer ein wichtiger Bestandteil für die DNS- und RNS-Synthese (4).

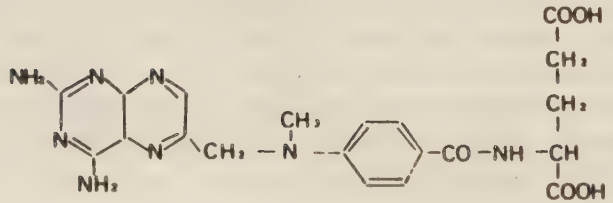
Der Mangel an Tetrahydrofolsäure führt damit zu einer Hemmung der Purinbiosynthese und zu verminderter Biosynthese von RNS und DNS,wobei im menschlichen Leukozyten durch Methotrexat die DNS-Synthese stärker gehemmt wird als die RNS-Synthese (19).Die Hemmung der Synthese von Thymidinmonophosphat ist der entscheidende Mechanismus für die Zelltoxizität des Methotrexates (19).

Als weiterer Angriffspunkt der Methotrexatwirkung wurde die direkte Hemmung des Enzyms Thymidinmonophosphat-Synthetase vermutet (6),wofür jedoch Methotrexat-Konzentrationen über 10^{-5} mol/l erforderlich sind (6).

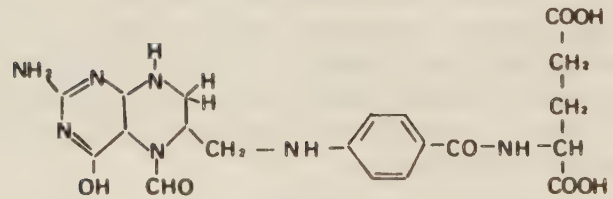
Da die Thymidinmonophosphatbildung aus Uridinmonophosphat durch Mangel an Tetrahydrofolsäure und direkte Hemmung der Thymidinmonophosphat-Synthetase behindert ist,kommt es über eine verminderte Rückkopplungshemmung durch Thymidintriphos-



Folsaure



Methotrexat



5 - Formyltetrahydrofolsaure

Abbildung 1

Strukturformeln von Folsäure, Methotrexat und 5-Formyltetrahydrofolsäure (Leukovorin)
(zitiert bei 26)

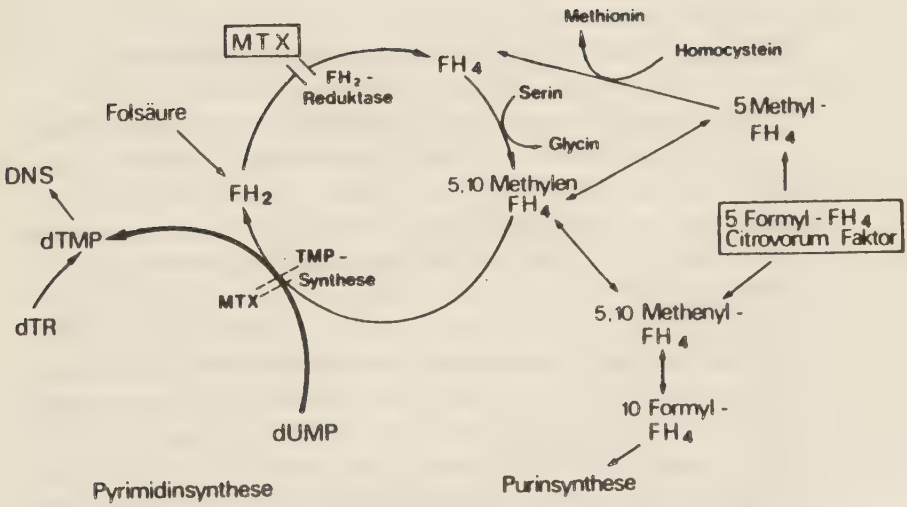


Abbildung 2

Darstellung des Folsäurezyklus und der Angriffspunkte des Methotrexates (MTX). FH_2=Dihydrofolsäure, FH_4=Tetrahydrofolsäure, dUMP=Uridinmonophosphat, dTMP=Thymidinmonophosphat, dTR=Thymidin
(zitiert bei 26)

phat (57) zu einer vermehrten Bildung von Thymidinmonophosphat aus Thymidin (Abb. 2) durch Steigerung der Aktivität der Thymidin-Kinase. Dieser Vorgang wird als "salvage pathway" bezeichnet.

Methotrexat hemmt die Pyrimidinsynthese und greift in hohem Maße spezifisch während der S-Phase ein: die Wirkung hängt vom Zellzyklus ab (4).

Tetrahydrofolsäure ist außerdem notwendig zur Umwandlung von Serin in Glycin und zur Umwandlung von Homocystein in Methionin (Abb. 2). Ein Mangel an Tetrahydrofolsäure führt zu einer Hemmung der Proteinbiosynthese (4). Methotrexat könnte dadurch Zellen in der G_1-Phase des Zellzyklus anhalten und das Eintreten in die S-Phase verhindern und auf diese Weise auf seine Wirkung einen selbstlimitierenden Effekt ausüben (4).

Für eine maximale Hemmung der DNS-Synthese muß neben der Sättigung der Bindungsstellen der Dihydrofolsäurereduktase auch freies intrazelluläres Methotrexat vorliegen (2,15). Im Tierversuch wurde bei niedrigen freien Methotrexatkonzentrationen vorwiegend die Thymidinmonophosphatsynthese, bei höheren Methotrexatkonzentrationen auch die Purinsynthese gehemmt (54).

2.2. Aufnahme des Methotrexates in die Zelle

Methotrexat wird über ein energieabhängiges aktives Transportsystem in die Zelle aufgenommen (13). Über das gleiche Carrier-System werden auch die natürlich vorkommenden reduzierten Folate wie N^5-Formyltetrahydrofolsäure und N^5-Methyltetrahydrofolsäure aktiv in die Zelle transportiert (13). Methotrexat wirkt damit auch über kompetitive Hemmung des Transportsystems für reduzierte Folate.

Das Osteosarkom ist primär nicht empfindlich auf konventionelle Methotrexatdosen, ein Ansprechen auf die Therapie erfolgt nur auf hochdosiertes Methotrexat (11): es wird vermutet, daß beim Osteosarkom das aktive Transportsystem für reduzierte Folate fehlt und eine Aufnahme nur durch passive Diffusion bei hohen extrazellulären Methotrexatkonzentrationen möglich ist (28,52).

2.3. Aufhebung der Methotrexatwirkung durch 5-Formyltetrahydrofolsäure (Citrovorumfaktor, Leukovorin)

2.3.1. Wirkungsmechanismus von Leukovorin (5-Formyltetrahydrofolsäure)

Bei der hochdosierten Methotrexattherapie wird im Anschluß an die Methotrexat-Applikation Leukovorin (5-Formyltetrahydrofolsäure, Citrovorumfaktor) gegeben. Damit steht eine in der zytostatischen Therapie einzigartige Möglichkeit zur Verfügung, die Wirkung eines Zytostatikums durch eine andere Substanz aufzuheben.

5-Formyltetrahydrofolsäure (Citrovorumfaktor, Leukovorin) wird im Körper größtenteils zu 5-Methyl-Tetrahydrofolsäure, den hauptsächlich wirksamen Metaboliten der reduzierten Folsäure, umgewandelt (34). 5-Methyl-Tetrahydrofolsäure wird in 5,10 Methylentetrahydrofolsäure oder weiter in 10-Formyltetrahydrofolsäure umgewandelt, die als Koenzyme für die Übertragung von C_1-Bruchstücken für die Pyrimidin- und Purinsynthese nötig sind (16)(Abb. 2).

Mit 5-Formyltetrahydrofolsäure werden der Zelle direkt reduzierte Folate zugeführt, die Blockade des Enzyms Dihydrofolsäurereduktase durch Methotrexat wird umgangen. Wirksam ist nur 5-Formyltetrahydrofolsäure, nicht aber Folsäure und Dihydrofolsäure (33).

Untersuchungen von Frei et al (11) sprechen dafür, daß durch Gabe von 5-Formyltetrahydrofolsäure die DNS-Synthese in normalen Knochenmarkszellen wieder in Gang kommt, nicht dagegen in Osteosarkomzellen (11).

Zur Erklärung dieser Selektivität der Leukovorinwirkung wird angenommen, daß Tumorzellen, bei denen das Methotrexat nur in hoher Dosierung wirkt, kein aktives Transportsystem für reduzierte Folate besitzen (11). Reduzierte Folate können von diesen Zellen nur über passive Diffusion bei hohen extrazellulären Folatkonzentrationen aufgenommen werden; 5-Formyl-Tetrahydrofolsäure (Leukovorin) in niedriger Dosierung kann nicht in das Zellinnere gelangen.

2.3.2. Zeitpunkt, Dosis und Dauer der Leukovorintherapie

Ohne wirksame Folatsubstitution durch Leukovorin sollen normale Zellen toxischen Methotrexatkonzentrationen - das sind für die besonders empfindlichen Gewebe Knochenmark und Schleimhäute des Gastrointestinaltraktes Konzentrationen über 2×10^{-8} mol/l - nicht länger als 42 bis 48 Stunden ausgesetzt sein (3,12,30).

Unter genügend hohen Leukovorinkonzentrationen tritt eine vollständige Normalisierung der DNS-Synthese ein. Das ist nach Untersuchungen von Bertino (3) und Sauer und Schalhorn (41) dann der Fall, wenn die Leukovorinkonzentration die Methotrexatkonzentration um das 10-fache übersteigt.

Bei der üblichen Leukovorindosierung von 15 mg alle 6 Stunden werden Plasmakonzentrationen für die 5-Methyl-Tetrahydrofolsäure, dem wichtigsten Metaboliten der 5-Formyl-Tetrahydrofolsäure, von $0,6 \times 10^{-6}$ mol/l bis 2×10^{-6} mol/l gemessen (34).

Damit ist Leukovorin in der üblichen Dosierung voll wirksam, wenn die Plasmakonzentrationen des Methotrexates bei $2x10^{-7}$ mol/l liegen. Das ist nach Untersuchungen von Janka (26) für Methotrexatinfusionen von 3-8,5 g/m^2 MTX über 6 Stunden bei normaler Pharmakokinetik nach 48 Stunden der Fall.

Liegen die 48-Stundenwerte der MTX-Plasmakonzentrationen nach Infusion von 3-8 g/m^2 Methotrexat über 4 bis 6 Stunden im Normbereich, d.h. nach Janka (27) unter $1x10^{-6}$mol/l, nach Stoller (45) unter $9x10^{-7}$mol/l, nach Nirenberg (36) unter $1x10^{-6}$mol/l, nach Tattersall (46) unter $5x10^{-7}$mol/l, so kann nach den Ergebnissen von Janka (26) Leukovorin nach 72 Stunden ohne Gefahr abgesetzt werden.

Bei 48-Stundenwerten der MTX-Plasmakonzentrationen im toxischen Bereich muß die Leukovorintherapie in höherer Dosierung fortgeführt werden (26): die MTX-Plasmakonzentrationen werden alle 24 Stunden gemessen und die Leukovorintherapie wird erst nach Erreichen einer Methotrexatkonzentration von $5x10^{-8}$ mol/l abgesetzt (26).

2.4. Toxizität des Methotrexates

Toxische Erscheinungen unter hochdosierter Methotrexattherapie betreffen vor allem Gewebe mit hohem Zellumsatz wie Knochenmark und Schleimhäute des Gastrointestinaltraktes.

Entscheidend für die Schwere der Toxizität ist nicht so sehr die Höhe der absoluten Methotrexat-Plasmakonzentration, sondern die Zeitdauer, in der die Zellen einer kritischen minimalen Plasma-MTX-Konzentration, -"Konzentrationsschwelle" genannt - , ausgesetzt sind (9,12,38). Der kritische Schwellenwert für Knochenmark und Schleimhäute des Gastrointestinaltraktes wird mit $2x10^{-8}$ mol/l angegeben (7), die kritische Zeitspanne mit 42 bis 48 Stunden (3,12,30).

Auch für die Entstehung einer Methotrexattoxizität an Leber und Lunge spielt die Länge der Exposition eine größere Rolle als die Höhe der Dosis: höhere Dosen in größeren Intervallen erzeugen weniger Toxizität als kleine Dosen über Tage bis Wochen (35,40,42,50,53).

2.5. Pharmakokinetik und Metabolisierung von Methotrexat

Nach intravenöser Gabe verteilt sich Methotrexat schnell im Extrazellulärraum und Gesamtkörperwasser (17,29). Im Plasma liegt Methotrexat überwiegend an Albumin gebunden vor, die Proteinbindung wird mit 70 bis 95 Prozent angegeben (31,43).

Der Haupteliminationsweg für das Methotrexat ist die Ausscheidung über die Nieren: über 90% des MTX werden innerhalb von 30 Stunden über die Nieren ausgeschieden (17,37,51), sowohl über glomeruläre Filtration als auch aktive Sekretion (31).

Im Stuhl erscheinen nur 1-2% des Methotrexates, da MTX einem enterohepatischen Kreislauf unterliegt (17,20). Während des enterohepatischen Kreislaufes wirken Bakterien des Intestinaltraktes auf das Methotrexat ein: ein Metabolit, 7-Hydroxy-Methotrexat kann während der späten Phase der Methotrexatausscheidung 7-33% der ausgeschiedenen Methotrexatmenge betragen (23). Wegen der 4-fach schlechteren Löslichkeit im Vergleich zum Methotrexat könnte das 7-Hydroxy-Methotrexat eine Rolle bei der Nierentoxizität durch Ausfällung von MTX in den Nierentubuli spielen (23).

Steinberg (44) untersuchte für Plasmakonzentrationen von 10^{-5}mol/l bis 10^{-8}mol/l den enterohepatischen Kreislauf des MTX bei Ratten in vivo und fand, daß 50% des zugeführten Methotrexates in der Galle erscheinen. Die Ausscheidung von Methotrexat in die Gallenflüssigkeit korrelierte mit dem

Plasmaspiegel mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,96 bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1%. Die MTX-Konzentration in der Gallenflüssigkeit war 27-fach höher als die im Plasma (44).

Die Elimination von Methotrexat aus dem Plasma erfolgt 3-phasisch (20): die mittlere Halbwertszeit für die erste Phase beträgt 0,75±0,11 Stunden, für die zweite Phase 3,49±0,55 Stunden und für die dritte Phase 29,99±4,44 Stunden. Die erste Phase dürfte der Verteilung im Extrazellulärraum und im Gesamtkörperwasser entsprechen, die zweite Phase der Ausscheidung über die Nieren und die dritte Phase einem enterohepatischen Kreislauf des Methotrexates (4,20).

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Patienten und Versuchsprotokoll

13 Patienten mit osteogenem Sarkom im Alter von 11 bis 16 Jahren erhielten 139 Behandlungszyklen mit hochdosiertem Methotrexat nach dem Therapieschema T-7 oder T-10 nach Rosen (40a, 40b) (Abb. 3 und 4). Die Methotrexatdosis betrug 7,6 g/m^2 bis 12,7 g/m^2 Körperoberfläche. Bei insgesamt 139 Behandlungszyklen wurde der Verlauf der MTX-Plasmakonzentrationen bestimmt.

Sitz des Tumors war in 7 Fällen der distale Femur, in 4 Fällen die proximale Tibia, in einem Fall die Clavicula und einmal der distale Radius.

Alle Patienten bekamen vor Beginn der Chemotherapie zur Hydrierung eine 3-4 stündige Infusion mit 5 ml/kg/h Glucose-Kochsalzlösung (2:1) verabreicht, die zur Einstellung des Urins auf pH-Werte zwischen 7 und 8 Natriumbikarbonat enthielt.

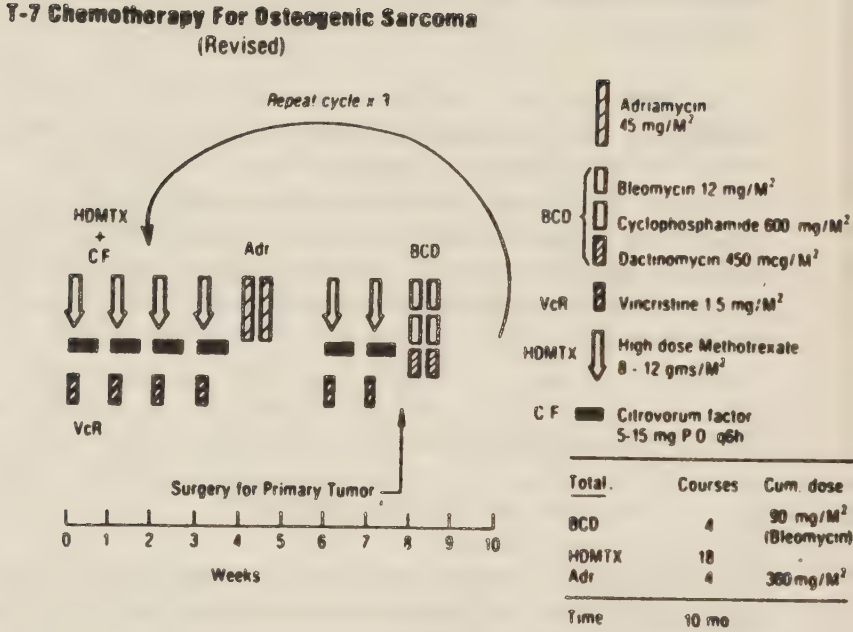


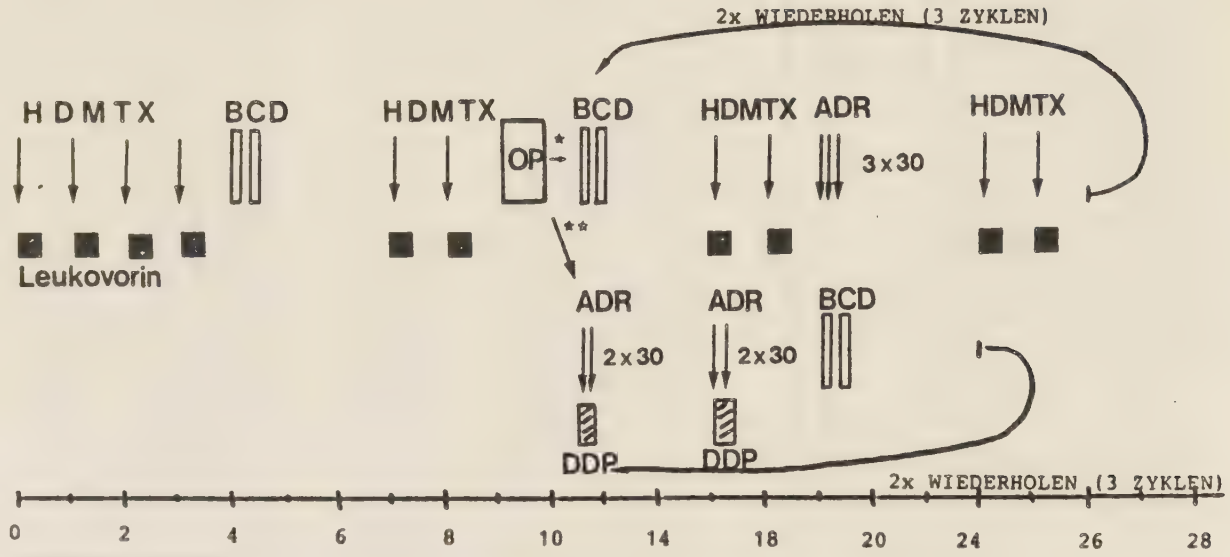
Abbildung 3

Therapieprotokoll T-7 zur Behandlung von Patienten mit osteogenem Sarkom
(zitiert bei 26)

Abbildung 4

C H E M O T H E R A P I E D E S O S T E O G E N E N S A R K O M S

(Modifiziert: T 7 + 10 R O S E N)



* GRAD III + IV
** GRAD I + II

ADR: ADRIBLASTIN 30 mg/m^2 iv x 2 bzw. 3 Tage

DDP: CIS-PLATIN 20 mg/m^2 iv x 5 Tage

HDMTX: 8 - 12 g/m^2 iv

LEUKOVORIN: 15 mg p.o. x 10 alle 6 Std. Beginn 20 Std. n. MTX

BCD: BLEOMYCIN: 15 mg/m^2/d iv
ENDOXAN: 600 mg/m^2/d iv
ACTINOMYCIN-D: 0,6mg/ d iv

] an 2 aufeinanderfolgenden Tagen

Das Methotrexat wurde in 500 ml einer 5%igen Glucoselösung über 4 Stunden infundiert. Bei Therapieprotokoll T-7 bekamen die Patienten eine halbe Stunde vor der MTX-Gabe Vincristin in einer Dosierung von 1,5 g/m^2 Körperoberfläche verabreicht.

In den 24 Stunden nach Ende der Methotrexatinfusion schloß sich eine Hydrierung mit mindestens 80 ml/kg Körpergewicht Flüssigkeit an. Der pH-Wert des Urins war weiterhin auf einen Bereich von 7 bis 8 eingestellt.

Die Patienten erhielten 20 Stunden nach Beginn der MTX-Infusion Leukovorin in einer Dosierung von 15 mg per os im Abstand von 6 Stunden 10 mal.

Voraussetzung für eine MTX-Applikation war die Kontrolle folgender Laborwerte vor Therapiebeginn:

Blutbild (Hämoglobin, Leukozyten und Thrombozyten), Kreatinin und Kreatininclearance, Transaminasen. Einen, zwei, sieben und zehn Tage nach Infusion wurden diese Kontrollen nach Möglichkeit wiederholt.

Blutabnahmen für die Bestimmung der Methotrexat-Plasmakonzentrationen erfolgten in einem Teil der Fälle am Ende der Infusion, in allen Fällen 24 Stunden und 40, 42 oder 48 Stunden nach Infusion.

Ein toxischer Verlauf war definiert als Knochenmarksdepression (Leukozytenabfall unter 1000/mm^3 und/oder Thrombozytenabfall unter 100000/mm^3), schwere Stomatitis und renale Toxizität (Kreatininanstieg um über 50% des Ausgangswertes).

3.2. Bestimmung der Methotrexat-Plasmakonzentrationen

3.2.1. Materialien

Die Methotrexat-Plasmakonzentrationen wurden radioimmunologisch bestimmt. Die Trennung von freiem und antikörpergebundenem Methotrexat erfolgte nach der Methode der Kohleadsorption.

Die Patientenproben wurden als Serum oder Citratplasma eingesetzt. Die Lagertemperatur für Proben, die nicht sofort gemessen werden konnten, betrug -20 °C.

Verwendete Materialien:

Methotrexat (Lederle), ^{3}H-Methotrexat (14,5Ci/mmol) (Amersham/Buchler), 0,01 m Trispuffer (pH 7,4), Norit A (Serva, Heidelberg), Dextran T 70 (Pharmacia fine chemicals, Uppsala), Gamma-Globulin vom Rind, reinst (Behringwerke, Marburg), Natrium-Acid (Merck, Darmstadt), Szintillationsflüssigkeit Quickszint 402 (Zinsser, Frankfurt), Citrovorumfaktor und Folsäure (Serva, Heidelberg).

Das Antiserum produzierte das Labor selbst durch Immunisierung von Kaninchen mit einem Methotrexat-Rinderalbumin-Konjugat. Grundlage dafür war die Methode von Loeffler (31a).

Die Kohle-Dextransuspension zur Trennung von freiem und antikörpergebundenem Methotrexat hatte folgende Zusammensetzung: auf 200 ml Arbeitspuffer 1g Norit A, 0,1 g Dextran T 70, 0,2 g Gamma-Globulin, 0,064 g Natrium-Acid.

Das Verdünnungsverhältnis für das ^{3}H-Methotrexat in Puffer war so gewählt, daß 1 ml der Lösung 100.000 Counts per Minute (cpm) enthielt.

Das Antiserum wurde mit Puffer 1:1200 verdünnt.Als Reaktionsbehälter dienten Einmal-Glasröhrchen (11x75 mm).

Für die Messung der Radioaktivität der Assays stand ein Liquid-Szintillation Counter Tricarb 2450 (Packard,Frankfurt) zur Verfügung.

3.2.2. Durchführung der Methotrexat-Bestimmung

Der Radioimmunoassay umfaßte folgende Schritte:

1. Zugabe von 200 Mikroliter ^{3}H-MTX (ca. 20.000 cpm) und 200 Mikroliter Antiserum (1:1200) zu 5 Mikroliter einer Plasmaprobe.
2. Gemisch 15 Sekunden schütteln und 90 Minuten im Eiswasserbad inkubieren.
3. Trennung von freiem und antikörpergebundenem Methotrexat mit der Methode der Kohleadsorption:
   - Zugabe von 500 Mikroliter Kohle-Dextransuspension nach Ablauf der Inkubationszeit
   - 15 Minuten stehen lassen
   - Zentrifugation mit 1800 x g bei 4 ^{o}C über 10 Minuten
   - Dekantieren der Überstände mit dem antikörpergebundenen Methotrexat in 10 ml Szintillationsflüssigkeit
4. Messung der Radioaktivität im Szintillationscounter über 4 Minuten.

Proben und Standards waren jeweils 3-fach angesetzt.

Zur Erstellung einer Eichkurve wurden vom Labor durch Zugabe von Methotrexat zu Normalseren Standardseren mit MTX-Konzentrationen zwischen $2,5x10^{-8}$ mol/l bis $2,5x10^{-5}$ mol/l hergestellt.

Seren,die am Ende der Infusion abgenommen wurden und MTX-Plasmakonzentrationen von 10^{-3} mol/l bis 10^{-4} mol/l enthielten,mußten vor der MTX-Bestimmung mit Normalserum 1:1000 verdünnt werden.

Die gemessene Aktivität in cpm ergab sich als arithmetisches Mittel der Aktivitäten der drei eingesetzten Proben.Jede Meßserie hatte ihre eigene Eichkurve: die in den Standards gemessene Radioaktivität wurde gegen die eingegebenen MTX-Konzentrationen aufgetragen.Die Standardkurve wies ihren empfindlichsten Bereich zwischen $2,5x10^{-6}$ mol/l und $2,5x10^{-8}$ mol/l auf;durch entsprechende Verdünnung (siehe oben) von Proben mit höherer Konzentration ließ sich der Meßbereich auf $2,5x10^{-3}$ mol/l bis $2,5x10^{-8}$ mol/l erweitern.An dieser Eichkurve konnten die unbekannten MTX-Konzentrationen der Patientenproben abgelesen werden.

3.3. Qualität der Methotrexat-Bestimmung

Die Prüfung auf Spezifität des Antiserums für Methotrexat erfolgte durch Testung der Kreuzreaktion gegen Citrovorum-Faktor und Folsäure: die Kreuzreaktivität gegen beide Substanzen lag unter 0,01%.

Aus der 12-fachen Bestimmung eines Kontrollserums im gleichen Assay ergab sich die Reproduzierbarkeit innerhalb der Serie: der intraassay-Variationskoeffizient betrug 3,3%.

Die Reproduzierbarkeit von Tag zu Tag wurde durch Bestimmung zweier Kontrollseren verschiedener MTX-Konzentrationen an 12 aufeinanderfolgenden Bestimmungstagen ermittelt: bei einem Mittelwert von $8,7x10^{-7}$ mol/l errechnete sich der interassay-Variationskoeffizient zu 9,8%,bei einem Mittelwert von $3,5x10^{-7}$ mol/l zu 5,1%.

3.4. Ergebnisse

3.4.1. Normbereich der Methotrexat-Plasmakonzentrationen

Für die Aufstellung eines Normbereiches unter hochdosierter Methotrexattherapie mit 8-12g MTX/m^2 Körperoberfläche als Infusion über 4 Stunden wurden 116 hämatologisch atoxische Behandlungszyklen (Leukozytenabfall nicht unter 1.000/mm^3 und/oder Thrombozytenabfall nicht unter 100.000/mm^3) herangezogen. Der Normbereich wurde definiert durch die 5. und 95. Percentile der MTX-Plasmakonzentrationen am Ende der Infusion (n=41), 24 Stunden nach Infusion (n=116), 40 Stunden nach Infusion (n=25), 46 Stunden nach Infusion (n=23) und 48 Stunden nach Infusion (n=47). Zwischen der 5. und 95. Percentile liegen 90% der atoxischen Verläufe. Einen Überblick geben Abb. 5 und Tab. 1.

Die Methotrexat-Plasmakonzentrationen am Ende der 4-stündigen MTX-Infusion lagen zwischen $3{,}2 \times 10^{-3}$ mol/l (95. Percentile) und $3{,}2 \times 10^{-4}$ mol/l (5. Percentile). Die 50. Percentile, gleichbedeutend mit dem geometrischen Mittel, betrug $9{,}6 \times 10^{-4}$ mol/l.

24 Stunden nach Ende der Infusion reichte der Normbereich von $5{,}8 \times 10^{-6}$ mol/l (95. Percentile) bis $5{,}0 \times 10^{-7}$ mol/l (5. Percentile). Das geometrische Mittel war $1{,}3 \times 10^{-6}$ mol/l.

Die 40-Stundenwerte der MTX-Plasmakonzentrationen lagen im Bereich zwischen $8{,}2 \times 10^{-7}$ mol/l (95. Percentile) und $7{,}5 \times 10^{-8}$ mol/l (5. Percentile) bei einem geometrischen Mittel von $2{,}6 \times 10^{-7}$ mol/l.

Die 95. Percentile der MTX-Plasmakonzentrationen 46 Stunden nach Infusion betrug $7{,}5 \times 10^{-7}$ mol/l, die 5. Percentile $9{,}7 \times 10^{-8}$ mol/l, der Median $2{,}5 \times 10^{-7}$ mol/l.

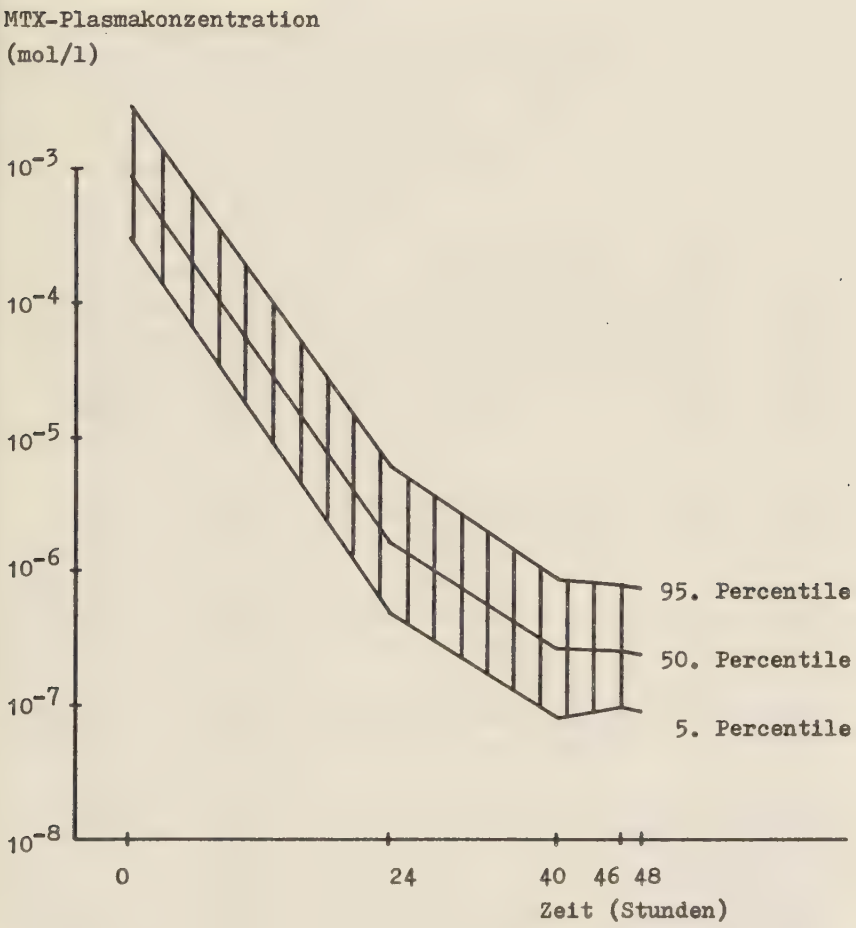


Abbildung 5

Normbereich der Methotrexat-Plasmakonzentrationen bei Patienten mit osteogenem Sarkom nach hochdosierter Methotrexattherapie mit 8-12 g MTX/m^2 Körperoberfläche

Zeit	Anzahl der MTX-Bestimmungen	MTX-Plasmakonzentration (mol/l) Percentilen		
		5.Percentile	50.Percentile	95.Percentile
Ende d. Infus.	41	$3,2 \times 10^{-4}$	$9,6 \times 10^{-4}$	$3,2 \times 10^{-3}$
24 Std. später	117	$5,0 \times 10^{-7}$	$1,3 \times 10^{-6}$	$5,8 \times 10^{-6}$
40 Std. später	25	$7,5 \times 10^{-8}$	$2,6 \times 10^{-7}$	$8,2 \times 10^{-7}$
46 Std. später	23	$9,7 \times 10^{-8}$	$2,5 \times 10^{-7}$	$7,5 \times 10^{-7}$
48 Std. später	47	$8,7 \times 10^{-8}$	$2,3 \times 10^{-7}$	$6,5 \times 10^{-7}$

Tabelle 1

MTX-Plasmakonzentrationen während und nach einer MTX-Infusion über 4 Stunden mit 8-12 g MTX/m^2 Körperoberfläche bei Patienten mit osteogenem Sarkom

48 Stunden nach Ende der MTX-Infusion reichte der Normbereich von $6,5x10^{-7}$ mol/l (95.Percentile) bis $8,7x10^{-8}$ mol/l (5.Percentile).Der Median betrug $2,3x10^{-7}$ mol/l.

Die Breite des Normbereiches umfaßte somit zu jedem Zeitpunkt etwa eine Zehnerpotenz.

Für die Ermittlung der mittleren Halbwertszeit der Plasma-MTX-Konzentrationen nach Infusion wurde der Verlauf der 50.Percentile (Abb. 5) herangezogen.Es wurden mehrfach die Zeiten ermittelt,in denen sich die logarithmisch aufgetragene MTX-Konzentration auf der Ordinate halbiert und aus diesen Zeiten der Mittelwert gebildet.

Für den Zeitraum bis 24 Stunden nach Infusionsende errechnete sich eine mittlere Halbwertszeit von 2,5 Stunden.

Zwischen 24 Stunden und 48 Stunden nach Infusionsende betrug die mittlere Halbwertszeit 9,6 Stunden.

3.4.2. Behandlungszyklen mit Methotrexat-Plasmakonzentrationen über dem Normbereich

3.4.2.1. Erhöhung des 24-Stundenwertes der Methotrexat-Plasmakonzentration

In 9 von 139 Behandlungszyklen war der 24-Stundenwert der MTX-Plasmakonzentration über die 95.Percentile des Normbereiches von $5,8x10^{-6}$ mol/l erhöht.Toxische Erscheinungen traten nur auf,wenn auch der 48-Stundenwert erhöht war (Tabelle 2).Die absolute Höhe der MTX-Plasmakonzentration 24 Stunden nach Ende der Infusion spielte keine Rolle für das Entstehen toxischer Erscheinungen.

Behandlungs-zyklus Nr.:	MTX-Plasmakonzentration 24 Std. n. Infusion (mol/l)	48 Std. n. Infusion	Nebenwirkungen der MTX-Infusion
(4)	$1,6x10^{-5}$	erhöht	schwere Stomatitis,heftiges Erbrechen
(34)	$5,2x10^{-5}$	normal	Zyklus unauffällig
(42)	$1,2x10^{-5}$	normal	Zyklus unauffällig
(68)	$2,5x10^{-5}$	normal	Zyklus unauffällig
(109)	$5,0x10^{-5}$	normal	Zyklus unauffällig
(137)	$1,0x10^{-5}$	erhöht	Stomatitis aphtosa,Erythem an beiden Ellenbogen,heft. Erbrechen
(9)	$7,0x10^{-6}$	erhöht	heftiges Erbrechen,Glieder-schmerzen,Appetitlosigkeit
(18)	$8,8x10^{-6}$	normal	Zyklus unauffällig
(115)	$6,6x10^{-6}$	erhöht	heftiges Erbrechen

Tabelle 2

Behandlungszyklen mit Methotrexat-Plasmakonzentrationen über dem Normbereich 24 Stunden nach Infusionsende

Normbereich: $5,0x10^{-7}$ mol/l bis $5,8x10^{-6}$ mol/l

3.4.2.2. Erhöhte Methotrexat-Plasmakonzentrationen 48 Stunden nach Infusionsende

In 10 Behandlungszyklen war der 48-Stundenwert der Methotrexat-Plasmakonzentration über den Wert der 95. Percentile von $6,5x10^{-7}$ mol/l erhöht:

- in 5 Fällen lagen die MTX-Plasmakonzentrationen zwischen $6,5x10^{-7}$ mol/l und $1,0x10^{-6}$ mol/l (Tabelle 3) - in keinem dieser Zyklen traten schwere Nebenwirkungen auf.

- in 5 Fällen (Tabelle 4) wurden 48-Stundenwerte über $1,0x10^{-6}$ mol/l gefunden. Dabei entwickelte sich in 2 Zyklen schwere Toxizität (Zyklen 4 und 11), in 2 Zyklen mäßige bis milde Toxizität (Zyklen 9 und 137), ein Zyklus verlief unauffällig (Zyklus 76).

In den Zyklen 4 und 9 wurde eine intensivierte Leukovoringabe durchgeführt: in Zyklus 4 kam es trotz Leukovorinrescue zu schweren toxischen Erscheinungen, in Zyklus 9 hielt sich die Toxizität in Grenzen.

In drei der 5 Behandlungszyklen mit erhöhtem 48-Stundenwert wurde keine verlängerte und intensivierte Leukovoringabe durchgeführt. Zyklus 11 führte unter dem Bild einer Sepsis, hämorrhagischen Diathese und aplastischen Krise zum Tod des Patienten, in Zyklus 137 zeigten sich Symptome mäßiger bis milder Toxizität, Zyklus 76 verlief unauffällig.

Die Ergebnisse zeigen, daß bei MTX-Plasmakonzentrationen 48 Stunden nach Infusion über $1,0x10^{-6}$ mol/l verstärkt mit schwerer Toxizität gerechnet werden muß.

Behandlungs-zyklus Nr.:	MTX-Plasmakonzentration 48 Std. n. Infusion (mol/l)	Nebenwirkungen der MTX-Therapie
(8)	$8,3 \times 10^{-7}$	Zyklus unauffällig
(10)	$7,0 \times 10^{-7}$	Exanthem an beiden Ellenbogen, Fieber bis 39,6 °C
(39)	$7,5 \times 10^{-7}$	Zyklus unauffällig
(75)	$8,0 \times 10^{-7}$	Leukozytenabfall bis 700/mm^3, sonst Zyklus unauffällig
(115)	$6,8 \times 10^{-7}$	gehäuftes Erbrechen, sonst Zyklus unauffällig

Tabelle 3

Erhöhung der MTX-Plasmakonzentrationen 48 Stunden nach Infusionsende bis $1,0 \times 10^{-6}$ mol/l

Normbereich 48 Stunden nach Infusion:
$8,7 \times 10^{-8}$ mol/l bis $6,5 \times 10^{-7}$ mol/l

Behandlungs-zyklus Nr.:	MTX-Plasmakonzentration 48 Std. n. Infusion (mol/l)	Nebenwirkungen der MTX-Therapie	Leukovorin-Rescue
(4)	$2,8x10^{-6}$	Fieber, Erbrechen, schwere Stomatitis, Leukopenie	ja
(9)	$1,5x10^{-6}$	Gliederschmerzen, Appetitlosigkeit	ja
(11)	$1,4x10^{-6}$	Sepsis, häm. Diathese, aplastische Krise, Tod	nein
(76)	$1,1x10^{-6}$	Zyklus unauffällig	nein
(137)	$1,5x10^{-6}$	Stomatitis aphtosa, Erythem an beiden Ellenbogen	nein

Tabelle 4

Erhöhung der MTX-Plasmakonzentrationen 48 Stunden nach Infusionsende über $1,0x10^{-6}$ mol/l

Normbereich 48 Stunden nach Infusion: $8,7x10^{-8}$ mol/l bis $6,5x10^{-7}$ mol/l

3.4.3. Hämatologische Toxizität

3.4.3.1. Schwere hämatologische Toxizität

Schwere hämatologische Toxizität wurde in 3 von 139 Behandlungszyklen im Zeitraum von 5 bis 15 Tagen nach MTX-Infusion gefunden (Tabelle 5).

Dabei war in 2 Fällen der 48-Stundenwert (Zyklus 11) oder der 42-Stundenwert (Zyklus 4) der Methotrexat-Plasmakonzentrationen über den Normbereich erhöht. In einem Fall (Zyklus 118) lag der 42-Stundenwert im Normbereich.

In Zyklus 11 trat 10 Tage nach hochdosierter Methotrexatgabe eine aplastische Krise mit Leukozytenwerten von 200/mm^3 und Thrombozytenwerten von 10000/mm^3 auf. Es entwickelten sich eine gramnegative Sepsis, Ikterus, hämorrhagische Diathese mit massiver Darmblutung und eine ausgedehnte Soorstomatitis. Der Patient verstarb an Herz-Kreislaufversagen bei massiver Darmblutung.

In Zyklus 4 hielt sich unter intensivierter Leukovorin-Rescue die hämatologische Toxizität in Grenzen: Leukozytenabfall bis 700/mm^3, Thrombozytenabfall bis 190000/mm^3. Zusätzliche Komplikationen waren eine schwere Stomatitis, gehäuftes Erbrechen und Fieber bis 39,6 °C.

Zyklus 118 war gekennzeichnet durch eine schwere Stomatitis, Erbrechen und Fieber bis 38,8 °C. Die Leukozytenzahl fiel ab auf Werte von 600/mm^3. Der tiefste Wert für die Thrombozyten betrug 92000/mm^3.

Behandlungs-zyklus Nr.:	MTX-Plasmakonz. 48 Std. n. Inf. (mol/l)	Leukozyten-tiefpunkt/mm^3	Thrombozyten-tiefpunkt/mm^3	sonstige Nebenwirkungen
(11)	$1,4x10^{-6}$	200	10.000	Sepsis, Ikterus, häm. Diathese, Tod
(118)	40 Std.-Wert $3,3x10^{-7}$	600	92.000	schwere Stomatitis, Erbrechen, Fieber
(4)	42 Std.-Wert $2,8x10^{-6}$	700	190.000	schwere Stomatitis, Erbrechen, Fieber

Tabelle 5

Behandlungszyklen mit schwerer Toxizität

Normbereiche der MTX-Plasmakonzentrationen:

40 Std.: $7,5x10^{-8}$ mol/l bis $8,2x10^{-7}$ mol/l

48 Std.: $8,7x10^{-8}$ mol/l bis $6,5x10^{-7}$ mol/l

In einem Behandlungszyklus mit schwerer Toxizität lagen die Methotrexat-Plasmakonzentrationen im Zeitraum von 40 bis 48 Stunden nach Infusionsende im Normbereich, in 2 Fällen waren die MTX-Plasmakonzentrationen über einen Wert von $1,0 \times 10^{-6}$ mol/l erhöht.

3.4.3.2. Mäßige hämatologische Toxizität

Mäßige hämatologische Toxizität im Zeitraum von 5 bis 15 Tagen nach MTX-Infusion entwickelte sich in 4 von 139 Behandlungszyklen (Tabelle 6). Die Veränderungen betrafen vor allem die Thrombozyten mit einem Tiefstwert von 55000/mm^3. Zusätzliche Komplikationen waren Fieber, Exantheme und Infektionen. Die MTX-Plasmakonzentrationen 48 Stunden nach Infusionsende lagen im Normbereich, nur in einem Fall war der Wert geringfügig erhöht.

3.4.3.3. Milde hämatologische Toxizität

Milde hämatologische Toxizität ohne sonstige Komplikationen im Zeitraum von 5 bis 15 Tagen nach Infusion zeigte sich in 9 von 139 Behandlungszyklen (Tabelle 7). Es waren überwiegend die Thrombozyten betroffen (in 7 von 9 Fällen), der tiefste Thrombozytenwert betrug 40.000/mm^3. Ein Leukozytenabfall war in 3 Fällen zu beobachten mit einem Tiefstwert von 400/mm^3.

3.4.3.4. Hämatologische Toxizität einen bis drei Tage nach Infusion

In 7 von 139 Behandlungszyklen trat hämatologische Toxizität im Zeitraum von 1-3 Tagen nach der MTX-Infusion auf (Tabelle 8). Die Veränderungen betrafen Leukozyten (4 der 7 Fälle) und Thrombozyten (5 der 7 Fälle) gleichermaßen. Ansonsten verliefen die Zyklen unauffällig mit MTX-Plasmakonzentrationen im Normbereich.

Behandlungs-zyklus Nr.:	MTX-Plasmakonz. 48 Std. n. Inf. (mol/l)	Leukozyten-tiefpunkt/mm^3	Thrombozyten-tiefpunkt/mm^3	sonstige Nebenwirkungen
(10)	$7,0x10^{-7}$	1300	55000	Exanthem an beiden Ellenbogen, Fieber bis 39,6 °C
(35)	$2,9x10^{-7}$	1800	58000	Enanthem li Ohr, Eiter aus Ohr
(44)	$2,5x10^{-7}$	1900	74000	Bakteriämie, Temperatur bis 39,4 °C, Pankreatitis
(85)	$2,5x10^{-8}$	1000	72000	Enanthem(Rachen), Fieber bis 40 °C, Bauchschmerzen

Tabelle 6

Behandlungszyklen mit mäßiger Toxizität

Normbereich der MTX-Plasmakonzentrationen:
48 Stunden: $8,7x10^{-8}$ mol/l bis $6,5x10^{-7}$ mol/l

Behandlungs-zyklus Nr.:	MTX-Plasmakonz. 48 Std. n. Inf. (mol/l)	Leukozyten-tiefpunkt/mm^3	Thrombozyten-tiefpunkt/mm^3	sonstige Nebenwirkungen
(2)	$1,8x10^{-7}$	400	230.000	Ulcera an der Unterlippe
(13)	$2,5x10^{-7}$	2300	66.000	Zyklus unauffällig
(17)	$4,5x10^{-7}$	3600	80.000	Zyklus unauffällig
(21)	$2,9x10^{-7}$	3100	94.000	Zyklus unauffällig
(22)	$2,2x10^{-7}$	800	50.000	Zyklus unauffällig
(29)	$1,0x10^{-7}$	6000	52.000	Fieber bis 39,2 °C
(34)	$0,8x10^{-7}$	1336	40.000	Zyklus unauffällig
(75)	$8,0x10^{-7}$	700	135.000	Zyklus unauffällig
(110)	$3,8x10^{-8}$	8000	96.000	Zyklus unauffällig

Tabelle 7

Behandlungszyklen mit milder Toxizität

Normbereich der MTX-Plasmakonzentrationen 48 Stunden nach Infusion:
$8,7x10^{-8}$ mol/l bis $6,5x10^{-7}$ mol/l

Behandlungszyklus Nr.:	MTX-Plasmakonz. 48 Std. n. Inf. (mol/l)	Leukozytentiefpunkt/mm^3	Thrombozytentiefpunkt/mm^3	sonstige Nebenwirkungen
(73)	$4,0x10^{-7}$	450	96.000	braune Maculae und rote Papeln an Rumpf und Extremitäten
(38)	$2,5x10^{-7}$	2500	80.000	Erbrechen
(57)	$1,3x10^{-7}$	967	78.000	Zyklus unauffällig
(66)	$1,4x10^{-7}$	750	328.000	Erbrechen
(81)	$8,7x10^{-7}$	3700	76.000	Erbrechen
(89)	$4,7x10^{-8}$	750	280.000	Zyklus unauffällig
(90)	$1,2x10^{-7}$	4300	96.000	Zyklus unauffällig

Tabelle 8

Behandlungszyklen mit hämatologischer Toxizität 1 bis 3 Tage nach MTX-Infusion

Normbereich der MTX-Plasmakonzentrationen 48 Stunden nach Infusion:
$8,7x10^{-8}$ mol/l bis $6,5x10^{-7}$ mol/l

3.4.3.5. Zusammenhang zwischen der Methotrexat-Plasmakonzentration und der Leukozyten- und Thrombozytenzahl

Um die Frage zu klären,ob ein linearer Zusammenhang zwischen der Methotrexat-Plasmakonzentration und der absoluten Höhe der Leukozyten- und Thrombozytenwerte besteht,wurden die Korrelationskoeffizienten der MTX-Plasmakonzentrationen 48 Stunden nach Infusion mit den Leukozyten- und Thrombozytenwerten 7 Tage nach Infusion berechnet.

Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe der Methotrexat-Plasmakonzentration und der Leukozyten- und Thrombozytenzahl.

3.4.4. Serumkreatininspiegel und Methotrexattoxizität

Es wurde untersucht,ob ein Anstieg der Serumkreatininkonzentration um mehr als 50% über den Ausgangswert innerhalb der ersten 2 Tage nach Infusion ein Kriterium für eine verzögerte MTX-Ausscheidung und damit drohende Toxizität darstellt.

Dies wäre denkbar,da die Niere den Hauptliminationsweg für das Methotrexat darstellt und da in den meisten Fällen ein verzögerter Abfall der MTX-Plasmakonzentrationen auf eine Nierenschädigung zurückgeführt wird.

In 105 von 139 Behandlungszyklen standen die Kreatininwerte vor und bis 48 Stunden nach MTX-Gabe zur Verfügung.

In 11 Fällen stieg die Serumkreatininkonzentration um mehr als 50% des Ausgangswertes an.Dabei waren 10 Anstiege falsch positiv: sie gingen nicht mit einem verzögerten Abfall der

MTX-Ausscheidung	Zahl der Fälle	Kreatininanstieg kleiner 50%	größer 50%	nicht bestimmt
normal	129	10	85	34
verzögert	10	1	9	0

Tabelle 9

Zusammenhang zwischen Methotrexatausscheidung und Serumkreatininanstieg im Zeitraum bis 48 Stunden nach Ende einer Methotrexatinfusion von 8-12 g MTX/m^2 Körperoberfläche

MTX-Plasmakonzentrationen einher.Die 48-Stundenwerte für die Plasmakonzentrationen des Methotrexates lagen im Normbereich. Alle Zyklen verliefen unauffällig.

Nur in einem von 10 Behandlungszyklen mit verzögerter MTX-Ausscheidung (48-Stundenwert über der 95. Percentile) war das Kreatinin um über 50% des Ausgangswertes erhöht (Tabelle 9).

Von den 3 Zyklen mit schwerer Toxizität lag in dem einen Fall mit normalen MTX-Plasmakonzentrationen kein Kreatininwert vor,in den beiden anderen Fällen stieg das Kreatinin nicht um über 50% des Ausgangswertes an.

Damit ist ein Anstieg des Serumkreatinins um über 50% des Ausgangswertes innerhalb der ersten 2 Tage nach Infusion kein geeignetes Kriterium zur Erfassung verzögerter MTX-Ausscheidung und zur Vorhersage drohender Toxizität.

Ein linearer Zusammenhang zwischen der MTX-Plasmakonzentration und dem Serumkreatininwert 48 Stunden nach Infusion besteht nicht: der Korrelationskoeffizient errechnete sich zu r=-0,04.

3.4.5. Lebertoxizität des Methotrexates

Für die Beurteilung der Lebertoxizität des Methotrexates wurden die Werte der Enzyme SGOT,SGPT und Gamma-GT 24 bis 48 Stunden und 7 Tage nach Infusion herangezogen.

24 bis 48 Stunden nach Infusion von 8-12 g MTX/m^2 Körperoberfläche über 4 Stunden waren über 30 I.U./l erhöht die SGOT in 75% der Zyklen,die SGPT in 83% und die Gamma-GT in 60% der Zyklen.

Enzyme SGOT, SGPT, Gamma-GT (I.U./l)	SGOT (n=118)		SGPT (n=118)		Gamma-GT (n=108)	
kleiner 30	30	(25%)	20	(17%)	43	(40%)
31 - 50	24	(20%)	22	(19%)	22	(20%)
51 - 100	46	(39%)	37	(31%)	35	(32%)
101 - 200	15	(13%)	19	(16%)	5	(5%)
größer 200	3	(3%)	20	(17%)	3	(3%)

Tabelle 10

Verhalten der Enzyme SGOT, SGPT und Gamma-GT 24 bis 48 Stunden nach Infusion von 8-12 g MTX/m^2 Körperoberfläche über 4 Stunden

Enzyme SGOT, SGPT, Gamma-GT (I.U./l)	SGOT (n=105)		SGPT (n=105)		Gamma-GT (n=92)	
kleiner 30	60	(57%)	32	(31%)	45	(49%)
31 - 50	24	(23%)	23	(22%)	16	(17%)
51 - 100	14	(13%)	22	(21%)	26	(29%)
101 - 200	4	(4%)	13	(12%)	5	(5%)
größer 200	3	(3%)	15	(14%)	-	-

Tabelle 11

Verhalten der Enzyme SGOT, SGPT und Gamma-GT 7 Tage nach Infusion von 8-12 g MTX/m^2 Körperoberfläche über 4 Stunden

Die höchsten Werte lagen für die SGOT bei 280 I.U./l,für die SGPT bei 630 I.U./l und für die Gamma-GT bei 353 I.U./l.

7 Tage nach Infusion war die SGOT noch über 30 I.U./l erhöht in 40%,die SGPT in 69% und die Gamma-GT in 51% der Zyklen (Tabelle 11).

Die Erhöhung der Enzyme SGOT,SGPT und Gamma-GT folgte keinem festen Muster: der Verlauf war nicht vorhersehbar.Eine signifikante Korrelation zwischen dem Anstieg der Enzyme SGOT, SGPT,Gamma-GT,der MTX-Plasmakonzentration und der MTX-Dosis bestand nicht.

Hämatologische Toxizität und Anstieg der Enzyme SGOT,SGPT und Gamma-GT waren nicht miteinander gekoppelt,sondern traten völlig unabhängig voneinander auf.

Die Erhöhung der Enzyme SGOT,SGPT und Gamma-GT trat bei manchen Patienten verstärkt auf: es scheint eine individuelle Abhängigkeit zu bestehen.Eine gesicherte Aussage ist auf Grund der geringen Fallzahl nicht möglich.

3.4.6. Sonstige Nebenwirkungen unter hochdosierter Methotrexattherapie

Erbrechen während oder bis einen Tag nach MTX-Gabe war in 66 von 139 Behandlungszyklen (47%) zu beobachten.Diese Nebenwirkung zeigte eine individuelle Häufung.Ein Zusammenhang zur MTX-Plasmakonzentration am Ende der Infusion bestand nicht.

Erbrechen als Symptom von Methotrexattoxizität wurde in 5 von 10 Fällen mit verzögerter Methotrexatausscheidung gefunden.

Eine Temperaturerhöhung über 38,5 °C wurde in 13 von 139 Behandlungszyklen (9%) gefunden: die MTX-Ausscheidung war dabei in einem Fall verzögert.

Ein Enanthem an den Schleimhäuten von Mund,Rachen,Vulva, Trommelfell zeigte sich in 14 der 139 Zyklen (10%): die MTX-Ausscheidung war in einem Fall verzögert.

Ein Exanthem entwickelte sich in 6 der 139 Zyklen (4%), wobei die MTX-Ausscheidung in 2 Fällen verzögert war.

4. Diskussion der Ergebnisse

4.1. Normbereich der Methotrexat-Plasmakonzentrationen

Besonders für die hochdosierte Methotrexattherapie ist die Kenntnis des Normbereiches der MTX-Plasmakonzentrationen entscheidend für eine zuverlässige Aussage über eine verzögerte Elimination (27).Das Ziel der vorliegenden Untersuchung bestand darin,einen Normbereich der Plasmakonzentrationen für hochdosierte Methotrexatinfusionen von 8-12 g MTX/m^2 Körperoberfläche über 4 Stunden anzugeben und die Toxizität des Methotrexates in Abhängigkeit von der Pharmakokinetik zu untersuchen.

Der in der vorliegenden Arbeit ermittelte Normbereich (Abb. 5, Tab. 1) stimmt gut mit dem von Wiesner (55) gefundenen Normbereich für Methotrexatdosen von 3-8,5 g/m^2 Körperoberfläche überein.Janka (26) gibt als oberen Normwert (95. Percentile) für Dosen von 9-14 g MTX/m^2 über 4 Stunden 24 Stunden nach Infusion einen Wert von $9,8 \times 10^{-6}$ mol/l an,der von uns gefundene Wert betrug $5,8 \times 10^{-6}$ mol/l.

48 Stunden nach Infusion war der von uns gemessene obere Normwert von $6,5x10^{-7}$ mol/l praktisch identisch mit dem von Janka (26) mitgeteilten Wert von $6,3x10^{-7}$ mol/l. Die mittlere Halbwertszeit der MTX-Plasmakonzentrationen im Zeitraum 24 bis 48 Stunden nach Infusion von 9,6 Stunden entsprach der von Janka angegebenen mittleren Halbwertszeit von 9 Stunden (26).

4.2. Kriterien zur Vorhersage drohender Methotrexattoxizität

4.2.1. 24-Stundenwert der Methotrexat-Plasmakonzentration

Isacoff (21a) berichtet, daß bei 24-Stundenwerten für die MTX-Plasmakonzentration über 10^{-5} mol/l verstärkt mit schwerer MTX-Toxizität gerechnet werden muß. In der vorliegenden Untersuchung hing das Auftreten toxischer Erscheinungen nicht von der Höhe des 24-Stundenwertes ab (Tabelle 2): toxische Erscheinungen traten nur auf, wenn auch der 48-Stundenwert der MTX-Plasmakonzentrationen erhöht war.

Die Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen von Wiesner (55) und Janka (26) überein, die ebenfalls den 24-Stundenwert der MTX-Plasmakonzentrationen nicht als hilfreiches Kriterium für die Vorhersage drohender Toxizität fanden.

4.2.2. 48-Stundenwert der Methotrexat-Plasmakonzentrationen

In 10 Fällen waren die MTX-Plasmakonzentrationen 48 Stunden nach Infusion über die 95. Percentile von $6,5x10^{-7}$ mol/l erhöht (Tabellen 3 und 4):

In 5 Fällen lagen die MTX-Plasmakonzentrationen zwischen $6,5x10^{-7}$ mol/l und $1,0x10^{-6}$ mol/l (Tabelle 3); schwerwiegende Nebenwirkungen waren nicht zu beobachten.

Von 5 Zyklen mit MTX-Plasmakonzentrationen über $1,0x10^{-6}$ mol/l (Tabelle 4) entwickelte sich in 2 Fällen schwere Toxizität: MTX-Plasmakonzentrationen 48 Stunden nach Infusion über $1,0x10^{-6}$ mol/l gehen gehäuft mit schwerwiegenden Komplikationen einher.

In der Literatur werden als toxische Grenzwerte, bei deren Überschreiten verstärkt mit schweren Komplikationen gerechnet werden muß, angegeben:

Stoller (45): 48-Stunden-MTX-Plasmakonzentration größer als $9x10^{-7}$ mol/l - Nirenberg (36): 24-Stundenwert größer als 10^{-5} mol/l, 48-Stundenwert größer als 10^{-6} mol/l, 72-Stundenwert größer als 10^{-7} mol/l - Tattersall (46): 48-Stundenwert größer als $5x10^{-7}$ mol/l - Janka (27): 48-Stundenwert größer als $1,0x10^{-6}$ mol/l - Evans (10): 24-Stundenwert größer als $5x10^{-6}$ mol/l, Halbwertszeit der MTX-Plasmakonzentrationen innerhalb der ersten 24 Stunden größer als 3,5 Stunden.

Eine normale MTX-Ausscheidung, d.h. MTX-Plasmakonzentrationen im Normbereich 40 bis 48 Stunden nach Infusion, bieten keine Gewähr für einen atoxischen Verlauf: in einem Fall (Tabelle 5, Zyklus 118) kam es zu schweren toxischen Erscheinungen bei MTX-Plasmakonzentrationen 40 Stunden nach Infusion im Normbereich.

Zusammenfassung: Schwere Komplikationen treten gehäuft auf, wenn der 48-Stundenwert der MTX-Plasmakonzentration über $1,0x10^{-6}$ mol/l liegt, können aber auch unter normaler MTX-Ausscheidung beobachtet werden.

4.2.3. Anstieg des Serumkreatinins als Kriterium zur Vorhersage drohender Methotrexattoxizität

Ausfällung von Methotrexat in den Nierentubuli kann zu einer erheblich verzögerten Ausscheidung von Methotrexat führen: 20% der Todesfälle unter hochdosierter Methotrexattherapie gehen zu Lasten eines Nierenversagens (49).

Pitman (39) schlug vor, einen Anstieg des Serumkreatinins über 50% des Ausgangswertes bis zum 2.Tag nach Infusion als Maß für die Nephrotoxizität des MTX zu bewerten.

In der vorliegenden Untersuchung wurde nur in 1 von 10 Zyklen mit verzögerter Methotrexatelimination ein Anstieg des Serumkreatinins um über 50% gefunden. Falsch positive Befunde waren in 10 von 105 Zyklen (9,5%) zu beobachten (Tabelle 9): das Serumkreatinin stieg um über 50% des Ausgangswertes an bei MTX-Plasmakonzentrationen im Normbereich.

Ein linearer Zusammenhang zwischen der Serumkreatininkonzentration und der MTX-Plasmakonzentration bestand nicht.

Die Bestimmung der Serumkreatininkonzentration erwies sich nicht als geeignetes Kriterium, um eine verzögerte Ausscheidung und drohende Toxizität des Methotrexates zu objektivieren.

Dieses Ergebnis stimmt mit den Angaben von Stoller (45), Isacoff (21a), Janka (26) und Wiesner (55) überein: sie fanden die Bestimmung des Serumkreatinins ebenfalls nicht als hilfreich zur Vorhersage drohender MTX-Toxizität.

4.3. Hämatologische Toxizität

Hämatologische Toxizität, definiert als Leukozytenabfall unter 1000/mm^3 und/oder Thrombozytenabfall unter 100000/mm^3, entwickelte sich in 23 von 139 Behandlungszyklen (16,5%): in 7 Fällen (5%) am 1.-3. Tag nach Infusion (Tabelle 8), in 16 Fällen (11,5%) am 5.-15. Tag nach Infusion.

Von den Zyklen mit hämatologischer Toxizität am 5.-15. Tag nach Infusion verliefen drei unter den Zeichen schwerer hämatologischer Toxizität (Tabelle 5): die MTX-Ausscheidung war in zwei Fällen verzögert, in einem Fall im Normbereich.

In den 4 Fällen mit mäßiger Toxizität (Tabelle 6) lag die MTX-Ausscheidung im Normbereich, ebenso in den 9 Fällen mit milder Toxizität (Tabelle 7).

Hämatologische Toxizität trat unabhängig von der Methotrexat-Plasmakonzentration auf: ein linearer Zusammenhang zwischen der MTX-Plasmakonzentration, der verabreichten Dosis und der Leukozyten- und Thrombozytenzahl bestand nicht.

In Zyklen mit verzögerter MTX-Ausscheidung kamen zur hämatologischen Toxizität gehäuft Komplikationen anderer Art wie z.B. schwere Stomatitis hinzu. In Zyklen mit normaler MTX-Ausscheidung verlief die hämatologische Toxizität bis auf eine Ausnahme ohne zusätzliche Komplikationen.

Zusammenfassung: Hämatologische Toxizität tritt zwar unabhängig von der MTX-Plasmakonzentration auf, schwere toxische Erscheinungen gehen aber gehäuft mit verzögerter MTX-Ausscheidung einher. Andererseits werden auch schwere toxische Verläufe unter normaler MTX-Ausscheidung gefunden.

Janka (26) fand bei vergleichbaren Dosen unter normaler MTX-Ausscheidung (48-Stundenwert kleiner $9,0x10^{-7}$ mol/l) in 17% hämatologische Toxizität. Infektiöse Komplikationen traten nicht auf (26). In der vorliegenden Untersuchung kam es in 3 Fällen mit 48-Stundenwerten unter $1,0x10^{-6}$ mol/l zu infektiösen Komplikationen (Tabelle 6).

Jaffe (24) und Chan (8) berichten, daß in 10% der Zyklen mit längerdauernder Knochenmarksdepression, Stomatitis oder einem Exanthem gerechnet werden muß.

4.4. Hepatotoxizität

24 bis 48 Stunden nach Infusion wurde eine Erhöhung der SGOT in 75%, der SGPT in 83% und der Gamma-GT in 60% gefunden (Tabelle 10).

7 Tage nach Infusion war die SGOT noch in 40%, die SGPT noch in 69% und die Gamma-GT in 51% der Zyklen über 30 I.U./l erhöht (Tabelle 11).

Ein Zusammenhang zwischen der MTX-Plasmakonzentration, der verabreichten Dosis und der Erhöhung der Enzyme bestand nicht. Der Anstieg war individuell stark verschieden und folgte keinem vorhersehbaren Muster.

Untersuchungen von Janka (26) in demselben Dosisbereich zeigten einen Anstieg der Serumtransaminasen über 30 I.U./l in 76% der Fälle. Niedrige Dosierungen über längere Zeit (500 mg MTX/m^2 über 24 Stunden) erwiesen sich als genauso toxisch wie hochdosiertes Methotrexat (3-8,5 g/m^2)(26). Im Gegensatz zu Dosen von 3-8,5 g/m^2 waren bei MTX-Gaben von 9-14 g/m^2 signifikant mehr Zyklen mit einer Erhöhung der Enzyme über 50 I.U./l zu beobachten (26).

Podurgiel (40) berichtet über Hepatotoxizität unter sehr niedrigen Methotrexatdosen. Zachariae (58) fand bei 10 von 39 Patienten, die im Rahmen einer Psoriasistherapie niedrige MTX-Dosen über lange Zeit erhalten hatten, eine Lebercirrhose.

Jaffe (24) fand in 61% unter hochdosierter MTX-Therapie einen Anstieg der Transaminasen. Pratt (37) beschreibt eine Dosisabhängigkeit der Enzymerhöhungen.

In der vorliegenden Untersuchung konnte kein linearer Zusammenhang zwischen den MTX-Plasmakonzentrationen und einer Erhöhung der Enzyme SGOT, SGPT und Gamma-GT nachgewiesen werden. Berichte über Mechanismen und Faktoren, die einen Einfluß auf die Höhe des Enzymanstieges haben, liegen in der Literatur nicht vor.

4.5. Sonstige Nebenwirkungen unter hochdosierter Methotrexattherapie

Zeichen von Neurotoxizität unter hochdosierter Methotrexattherapie wurden in der vorliegenden Untersuchung nicht beobachtet. Eine Neurotoxizität ist vor allem bei der intrathekalen Methotrexattherapie möglich, bei der im Liquor MTX-Konzentrationen bis 10^{-3} mol/l erreicht werden (5). Toxische Erscheinungen am Nervensystem werden vereinzelt auch nach hochdosierter intravenöser Methotrexattherapie beschrieben (1).

Pulmonale Toxizität trat nicht auf. Toxische Wirkungen des Methotrexates auf die Lunge äußern sich als Pneumonitiden (56). Sie sind selten und verlaufen gutartig. Unter hochdosierter MTX-Therapie werden sie nicht beobachtet (22). Urban (47) berichtet über eine Inzidenz von 8,5% für eine Pleuritis nach hochdosiertem Methotrexat. Klinisch verläuft sie unter dem Bild teilweise heftiger Brustschmerzen. Sie

dauert 3 bis 5 Tage und ist von benigner Natur.

Temperaturerhöhungen, Exantheme und Enantheme wiesen keinen Zusammenhang zur MTX-Plasmakonzentration auf.

5. Zusammenfassung

13 Patienten mit osteogenem Sarkom im Alter von 11 bis 16 Jahren erhielten 139 Behandlungszyklen mit hochdosiertem Methotrexat in einer Dosierung von 8-12 g/m^2 Körperoberfläche als Infusion über 4 Stunden. Es wurde die Toxizität des Methotrexates in Abhängigkeit von der Pharmakokinetik untersucht und ein Normbereich für die MTX-Plasmakonzentrationen 0 bis 48 Stunden nach Infusion angegeben.

Keinen Hinweis auf eine verzögerte Ausscheidung und drohende Methotrexattoxizität geben der 24-Stundenwert der Methotrexat-Plasmakonzentration und ein Anstieg des Serumkreatinins über 50% des Ausgangswertes innerhalb der ersten 2 Tage nach Infusion.

Das Risiko für schwerwiegende Komplikationen ist erhöht bei Methotrexat-Plasmakonzentrationen 48 Stunden nach Infusion über $1,0 \times 10^{-6}$ mol/l. Andererseits werden schwere toxische Verläufe auch unter MTX-Plasmakonzentrationen im Normbereich gefunden.

Die Erhöhung der Enzyme SGOT, SGPT und Gamma-GT, die Leukozyten- und Thrombozytenzahlen zeigen keinen linearen Zusammenhang zur Methotrexat-Plasmakonzentration.

Leichtere Komplikationen wie Fieber, Exanthem, Enanthem, hämatologische Toxizität ohne sonstige schwere Nebenwirkungen treten unabhängig von der Methotrexat-Plasmakonzentration auf.

6. Literaturverzeichnis

1. Allen JC, Rosen G, Mehta BM, Horten B: Leukoencephalopathy following high-dose iv methotrexate chemotherapy with leucovorin rescue.
Cancer Treat Rep 64: 1261-1273 (1980)

2. Bender RA, Bleyer WA, Drake JC, Ziegler JL: In vitro correlates of clinical response to methotrexate in acute leukemia and Burkitt's lymphoma.
Br J Cancer 34: 484-492 (1976)

3. Bertino JR: "Rescue"-Techniques in cancer chemotherapy. Use of leukovorin and other rescue agents after methotrexate treatment.
Semin Oncol 4: 203-216 (1977)

4. Bleyer WA: The clinical pharmacology of methotrexate.
Cancer 41: 36-51 (1978)

5. Bleyer WA, Drake JC, Chabner BA: Neurotoxicity and elevated cerebrospinal-fluid methotrexate concentration in meningeal leukemia.
N Engl J Med 289: 770-773 (1973)

6. Borsa J,Whitmore GF: Studies relating to the mode of action of methotrexate.III.Inhibition of the thymidilate synthetase in tissue culture cells and in cell-free systems.
Mol Pharmacol 5: 318-332 (1969)

7. Chabner BA, Young RC: Threshold methotrexate concentration for in vivo inhibition of DNA synthesis in normal and tumorous target tissues.
J Clin Invest 52: 1804-1811 (1973)

8. Chan H, Evans WE, Pratt CB: Recovery from toxicity associated with high-dose methotrexate: prognostic factors.
Cancer Treat Rep 61: 797-804 (1977)

9. Eichholtz H, Trott KR: Effect of methotrexate concentration and exposure time on mammalian cell survival in vitro.
Br J Cancer 41: 277-284 (1980)

10. Evans WE, Pratt CB, Taylor RH, Barker LF, Crom WR: Pharmacokinetic monitoring of high-dose methotrexate.
Cancer Chemother Pharmacol 3: 161-166 (1979)

11. Frei E III, Jaffe N, Tattersall M, Pitman S, Parker L: New approaches to cancer chemotherapy with methotrexate.
N Engl J Med 292: 846-851 (1975)

12. Goldie JH, Price LA, Harrap KR: Methotrexate toxicity: Correlation with duration of administration,plasma levels,dose and excretion pattern.
Eur J Cancer 8: 409-414 (1972)

13. Goldman ID: The characteristics of the membrane transport of amethopterin and the naturally occuring folates.
Ann NY Acad Sci 186: 400-437 (1971)

14. Goldman ID: Membrane transport of methotrexate (NSC-740) and other folate compounds: relevance to rescue protocols.
Cancer Chemother Rep 59: 63-72 (1975)

15. Goldman ID: Effects of methotrexate on cellular metabolism: some critical elements in the drug-cell interaction.
Cancer Treat Rep 61: 549-558 (1977)

16. Harper HA, Löffler G, Petrides PE, Weiss L (Herausgeber): Physiologische Chemie.
Springer Verlag. Berlin 1975.

17. Henderson ES, Adamson RH, Oliverio VT: The metabolic fate of tritriated methotrexate.II.Absorption and excretion in man.
Cancer Res 25: 1018-1024 (1965)

18. Hoff DD von, Penta JS, Helman LJ, Slavik M: Incidence of drug-related deaths secondary to high-dose methotrexate and citrovorum factor administration.
Cancer Treat Rep 61: 745-748 (1977)

19. Hofflerend AV, Tripp E: Unbalanced deoxyribonucleotide synthesis caused by methotrexate.
Br Med J 2: 140-142 (1972)

20. Huffman DH, Wan SH, Azarnoff DL, Hoogstraten B: Pharmacokinetics of methotrexate.
Clin Pharmacol Ther 14: 572-579 (1973)

21. Isacoff WH, Morrison PF, Aroesty J et al: Pharmacokinetics of high-dose methotrexate with citrovorum factor rescue.
Cancer Treat Rep 61: 1665-1674 (1977)

21a. Isacoff WH, Townsend Jr CM, Eilber FR, Forster T, Morton DL, Block JB: High dose methotrexate therapy of solid tumors: observations relating to clinical toxicity.
Med Pediatr Oncol 2: 319-325 (1976)

22. Isacoff WH, Eilber FR, Tabarrah H, Klein P, Dollinger M, Lemkin S, Sheeley P, Cone L, Rosenbloom B, Sieger L, Block JB: Phase II clinical trial with high dose methotrexate therapy and citrovorum factor rescue.
Cancer Treat Rep 62: 1295-1304 (1978)

23. Jacobs SA, Stoller RG, Chabner BA, Johns DG: Dose-dependent metabolism of methotrexate in man and rhesus monkeys.
Cancer Treat Rep 61: 651-656 (1977)

24. Jaffe N, Traggis D: Toxicity of high-dose methotrexate (NSC-740) and citrovorum factor (NSC-3590) in osteogenic sarcoma.
Cancer Chemother Rep 59: 31-36 (1975)

25. Jaffe N, Frei E III, Watts H, Traggis D: High dose methotrexate in osteogenic sarcoma: a 5 year experience.
Cancer Treat Rep 62: 259-264 (1978)

26. Janka GE: Hochdosierte und mittelhochdosierte Methotrexattherapie bei Kindern mit Leukämie und soliden Tumoren: Bedeutung der Bestimmung von Blut- und Liquorkonzentrationen für die Verlaufskontrolle.
Habilitationsschrift. München 1982.

27. Janka GE, Wiesner H, Bidlingmaier F, Haas RJ: Hochdosierte Methotrexattherapie beim osteogenen Sarkom: Plasmapharmakokinetik zur Vorhersage der Toxizität.
Klin Wschr 57: 411-416 (1979)

28. Kessel D, Hall TC, Roberts D: Modes of uptake of methotrexate by normal and leukemic human leukocytes in vitro and their relation to drug response.
Cancer Res 28: 564-570 (1968)

29. Leme PR, Creaven PJ, Allen LM, Berman M: Kinetic model for the disposition and metabolism of methotrexate and high-dose methotrexate (NSC-740) in man.
Cancer Chemother Rep 59: 811-817 (1975)

30. Levitt M, Mosher MB, De Conti RC, Farber LR, Skeel RT, Marsh JC, Mitchell MS, Papac RJ, Thomas ED, Bertino JR: Improved therapeutic index of methotrexate with "leukovorin rescue".

31. Liegler DG, Henderson ES, Hahn MA, Oliverio VT: The effects of organic acids on renal clearance of methotrexate in man.
Clin Pharmacol Ther 10: 849-857 (1969)

31a. Loeffler LJ, Blum MR, Nelsen MA: A radioimmunoassay for methotrexate and its comparison with spectrofluorimetric procedures.
Cancer Res 36: 3306-3311 (1976)

32. Marcove RC, Mike V, Hajek JV, Levin AG, Hutler RV: Osteogenic sarcoma under the age of twenty one: a review of one hundred and fourty-five operative cases.
J Bone Joint Surg 52: 411-423 (1970)

33. Mead JAR, Venditti JM, Schrecker AW, Goldin A, Keresztesy JC: The effect of reduced derivates of folic acid on toxicity and antileukaemic effects of methotrexate in mice.
Biochem Pharmacol 12: 371-383 (1963)

34. Mehta BM, Gisolfi AL, Hutchison DJ, Nirenberg A, Kellick MG, Rosen G: Serum distribution of citrovorum factor and 5-methyl-tetrahydrofolate following oral and im administration of calcium leukovorin in normal adults.
Cancer Treat Rep 62: 345-350 (1978)

35. Nesbit M, Krivit W, Heyn R, Sharp H: Acute and chronic effects of methotrexate on hepatic,pulmonary and skeletal systems.
Cancer 37: 1048-1054 (1976)

36. Nirenberg A, Mosende C, Mehta BM, Gisolfi AL, Rosen G: Hihg dose methotrexate with CF rescue: Predictive value of serum methotrexate concentrations and corrective measures to avert toxicity.
Cancer Treat Rep 61: 779-783 (1977)

37. Pratt CB, Roberts D, Shanks E, Warmath EL: Response, toxicity and pharmacokinetics of high-dose methotrexate (NSC-740) with citrovorum factor (NSC-3590) rescue for children with osteosarcoma and other malignant tumors. Cancer Chemother Rep 59: 14-18 (1975)

38. Pinedo HM, Chabner BA: Role of drug concentration, duration of exposure,and endogenous metabolites in determing methotrexate cytotoxicity. Cancer Treat Rep 61: 709-715 (1977)

39. Pitman SW, Parker LM, Tattersall MHN, Jaffe N, Frei E III: Clinical trials of high-dose methotrexate (NSC-740) with citrovorum factor (NSC-3590) - toxicologic and therapeutic observations. Cancer Chemother Rep 59: 43-49 (1975)

40. Podurgiel BJ, Mc Gill DB, Ludwig J, Taylor WF, Miller SD: Liver injury associated with methotrexate therapy for psoriasis. Mayo Clin Proc 48: 787-792 (1973)

40a. Rosen G, Marcove RC, Caparris B, Nirenberg A, Kosloff C, Huvos AG: Primary osteogenic sarcoma.The rationale for preoperative chemotherapy and delayed surgery. Cancer 43: 2163-2177 (1979)

40b. Rosen G, Caparros B, Huvos AG, Kosloff C, Nirenberg A, Cacavio A, Marcove RC, Lane JM, Mehta B, Urban C: Preoperative chemotherapy for osteogenic sarcoma: selection of postoperative adjuvant chemotherapy based on the response of the primary tumor to preoperative chemotherapy. Cancer 49: 1221-1230 (1982)

41. Sauer H, Schalhorn A: Rationale Grundlagen und Praxis des Citrovorumfaktor (Leukovorin) -Schutzes nach hochdosierter Methotrexat-Therapie.
Onkologie 3: 64-71 (1980)

42. Sostman HD, Matthay RA, Putman DE, Smith GJW: Methotrexate induced pneumonitis.
Medicine 55: 371-388 (1976)

43. Steele WH, Lawrence JR, Stuart JFB, Mc Neill CA: The protein binding of methotrexate by the serum of normal subjects.
Eur J Clin Pharmacol 15: 363-366 (1979)

44. Steinberg SE, Campbell CL, Bleyer WA, Hillman RS: Enterohepatic circulation of methotrexate in rats in vivo.
Cancer Res 42: 1279-1282 (1982)

45. Stoller RC, Hande KR, Jacobs SA, Rosenberg SA, Chabner BA: Use of plasma pharmacokinetics to predict and prevent methotrexate toxicity.
N Engl J Med 297: 630-634 (1977)

46. Tattersall MHN, Parker LM, Pitman SW, Frei E III: Clinical pharmacology of high-dose methotrexate (NSC-740).
Cancer Chemother Rep 59: 25-29 (1975).

47. Urban C,Nirenberg A, Caparros B, Anac S, Cacavio A, Rosen G: Chemical pleuritis as the cause of acute chest pain following high-dose methotrexate treatment.
Cancer 51: 34-37 (1983)

48. Valerino DM, Johns DG, Zaherco DS, Olivero VT: Studies on the metabolism of methotrexate by intestinal flora.Identification and study of the biological properties of the metabolite 4-amino-4-deoxy-N^{10}--methyl-pteroic acid.
Biochem Pharmacol 21: 821-831 (1972)

49. Von Hoff DD,Penta JS, Helman LJ, Slavik M: The incidence of drug related deaths secondary to high dose methotrexate and citrovorum factor administration.
Cancer Treat Rep 61: 745-748 (1977)

50. Wall MA, Wohl MEB, Strieder DJ, Jaffe N: Lack of effect of high-dose methotrexate on lung function.
Proc Am Ass Cancer Res 18: 58 (1977) (abstract)

51. Wang YM, Lantin E, Sutow WW:
Methotrexate in blood,urine and cerebrospinal fluid of children receiving high doses by infusions.
Clin Chem 22: 1053-1056 (1976)

52. Warren RD, Nichols AP, Bender RA: Membrane transport of methotrexate in human lymphoblastoid cell lines.
Cancer Res 38: 668-671 (1978)

53. Weinstein GD: Methotrexate.
Ann Intern Med 86: 199-204 (1977)

54. White JC, Loftfield S, Goldman ID: The mechanism of action of methotrexate.III.Requirement of free intracellular methotrexate for maximal suppression of ^{14}C-formate incorporation into nucleic acids and proteins.
Mol Pharmacol 11: 287-297 (1975)

55. Wiesner H: Hochdosierte Methotrexattherapie beim osteogenen Sarkom im Kindesalter: Pharmakokinetische Untersuchungen mit einem spezifischen Radioimmunoassay.
Dissertation. München 1981.

56. Willson JKV: Pulmonary toxicity of antineoplastic drugs.
Cancer Treat Rep 62: 2003-2008 (1978)

57. Wilmanns W: Die Thymidin-Kinase in normalen und leukämischen myeloischen Zellen.
Klin Wschr 45: 505-511 (1967)

58. Zachariae H, Kragballe K, Søgaard H: Methotrexate induced liver cirrhosis.
Brit J Dermat 102: 407-412 (1980)

7. Lebenslauf

Ich bin am 06.07.1954 in Reschdobl, Landkreis Rottal-Inn, geboren.

Von 1960 bis 1965 besuchte ich die Volksschule in Beutelsbach, von 1965 bis 1974 das mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium in Vilshofen. In den Jahren 1974 und 1975 leistete ich meinen Wehrdienst in Passau ab.

Im Sommersemester 1976 nahm ich das Studium der Medizin an der Ludwigs-Maximilians-Universität in München auf, das ich am 15.11.1982 mit der Approbation als Arzt abschloß. Seit Ende des Studiums arbeite ich an der Fertigstellung meiner Dissertationsarbeit.

München, 02.08.1983

Wolfgang Spiegl

Am Ende der Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. O. Goetz für das Korreferat.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. J. Haas für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit.

Danken möchte ich auch Frau Dr. Schmidt und den Mitarbeiterinnen des hämatologischen Labors für Ihr stets freundliches Entgegenkommen.